©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

# Vitalfärbungsstudien mit Chrysoidin

## Über Permeabilität und Quellung vitalgefärbten Plasmas

Von Lothar Hofmeister, Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 24. Juni 1948)

## I. Einleitung.

Die Vitalfärbung ist gleich wichtig als Forschungsgebiet wie als Arbeitsmethode der Zellphysiologie. Für beide Bereiche ist es von Bedeutung, zu erfahren, wieweit die gefärbte Zelle normal bleibt oder in welchem Maße sie Veränderungen jener Eigenschaften erleidet, welche das lebende Plasma zu charakterisieren geeignet und einer Bestimmung zugänglich sind. Die Permeabilität vitalgefärbter Protoplaste ist als unschwer zu bestimmende Plasmaeigenschaft Gegenstand der vorliegenden Untersuchung[1].

In einer früheren Studie (Hofmeister, 1938)[2] habe ich festgestellt, wieweit Vitalfärbung mit Neutralrot oder Methylenblau die Permeabilität für Harnstoff und Glyzerin verändert. Es ergab sich, daß schwache Anfärbung die Permeabilität von Elodea-Blattzellen nur unwesentlich beeinflußt (leichte Förderung) und daß erst bei Bildung der bekannten Farbniederschläge im Zellsaft eine Permeabilitätshemmung einsetzt; dann sinkt die Durchlässigkeit je nach Intensität der Färbung auf die Hälfte, bei stärkerer Anfärbung auf ein Viertel und weniger des Kontrollwertes. Von zwölf anderen, mit Neutralrot nur orientierend geprüften Objekten zeigten vier ebenfalls Hemmung der Harnstoffpermeation, während acht andere keinen nennenswerten Einfluß erkennen ließen.

[1] Die Experimente zu dieser Untersuchung wurden zwischen März und Juli 1946 am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien durchgeführt, die Niederschrift erfolgte 1948 am Botanischen Institut.

[2] Eine vorangegangene einschlägige Untersuchung „Studien über die Permeabilität vitalgefärbter Pflanzenzellen. I. Versuche mit Neutralrot und Methylenblau" (Zeitschr. f. wiss. Mikr., **55**, 393) ging auf eine Anregung aus dem Jahre 1937 zurück, für die ich Herrn Professor E. Küster sehr zu Dank verpflichtet bin.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Für die Anwendung der Vitalfärbung als Arbeitsmethode zieht schon der damalige Befund die Forderung nach sich, die Färbung nicht weiter vorzutreiben, als es für den angestrebten Zweck unbedingt nötig ist, und sich durch orientierende Versuche zu vergewissern, ob diejenigen Plasmaeigenschaften, welche Gegenstand der Versuche sind, unverändert bleiben.

Da Neutralrot und Methylenblau lediglich die Vakuole (und die Zellmembran), intaktes Plasma jedoch nicht färben, die Permeabilität aber eine Eigenschaft gerade des Plasmas ist, lag es nahe, einen Farbstoff in seiner Wirkung auf die Permeabilität zu studieren, der das Plasma selbst anfärbt und so unmittelbaren Einfluß auf seine Eigenschaften nehmen kann. Als Plasmafarbstoff wählte ich Chrysoidin, das meine Objekte in gleichmäßiger und leicht reproduzierbarer Weise färbte[3].

Färbung lebenden Plasmas mit Chrysoidin wurde durch Ruhland (1912) beschrieben. Die Unschädlichkeit dieses vitalen Färbemittels ist mehrfach belegt. So fand Schaede (1923) Wurzelhaare von Hydrocharis nach sechsstündiger Färbedauer noch ohne Schädigung und benützte (1924) Vitalfärbung des Plasmas mit Chrysoidin als Hilfsmittel zum Studium der Zell- und Kernteilung verschiedener Objekte. Nach Wulff (1934) ist der Farbstoff für Pollenschläuche völlig unschädlich, so daß sie auch im gefärbten Zustand die Samenanlagen erreichen und die Befruchtung und Samenentwicklung zustande kommt. Wulff fand weiter Unschädlichkeit für die Zellen der Küchenzwiebel; Lanz (1936) erwähnt das gleiche bezüglich Allium, beschreibt dagegen Schädigungen des empfindlicheren Objektes Spirogyra. Guilliermond und Gautheret (1938 a, b) kultivierten Saprolegnia unter Beimengung von Chrysoidin zum Nährsubstrat und beobachteten trotz der Plasmafärbung Wachstum, wenn auch verringerter Intensität. Drawert (1940) verdanken wir genaue Angaben über die Verteilung des in Puffern von unterschiedlichem $p_H$ gelösten Farbstoffes auf Zellsaft, Plasma und Membran der inneren und äußeren Epidermis der Allium-Zwiebelschuppen, ferner über die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und über die Dissoziationsverhältnisse unter den gleichen Umständen.

## II. Methodisches.

Als Diosmotikum wurde wie seinerzeit (1938) zunächst Harnstoff, daneben gelegentlich Glyzerin, Glykol Erythrit, ferner Methylharnstoff und Malonamid angewendet. Die durch Bogen (1937—1941) geäußerten

[3] Über Prune pure siehe S. 63.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Bedenken gegen die Verwendung von Harnstoff und Glyzerin in Permeabilitätsuntersuchungen wurden erwogen. Bei den verwendeten Objekten ist jedoch der Permeationsverlauf in beiden Substanzen gleichmäßig, so daß eine Beeinflussung der Permeabilität durch das Diosmotikum selbst nicht vorliegen kann[4]. Daß die Harnstoffpermeabilität experimentell vielleicht leichter zu verändern ist als die für manche andere Substanz, spricht mehr für als gegen die Anwendung dieses Stoffes in der vorliegenden Untersuchung.

Die Versuchsobjekte vertrugen die Vitalfärbung, den Permeabilitätsversuch und den kombinierten Einfluß beider gut. Es waren Narcissus pseudonarcissus L. (innere Epidermis der Zwiebelschuppen), Solanum tuberosum L. (Blattstielepidermis) und Daucus carota L. (Blattstielepidermis). Narcissus zeigt mittlere Permeabilität für Harnstoff und Glyzerin, die beiden anderen Objekte sind für Harnstoff hochpermeabel[5].

Die Permeabilitätsbestimmung wurde bei Narcissus zur Gänze nach der plasmometrischen Methode ausgeführt, bei Solanum und Daucus dagegen überwiegend durch Berechnung nach der Deplasmolysezeit (Höfler, 1943; Hofmeister, 1949); gelegentlich wurde auch bei diesen Objekten ein plasmometrischer Wert nebenher gemessen. Mit langsam permeierenden Verbindungen (Erythrit, Malonamid) wurden nur plasmometrische Bestimmungen vorgenommen.

Die plasmometrische Methode ist allgemein bekannt; nur zur Auswertung muß bemerkt werden, daß die Permeationskonstante P′ hier durchgehend unter Verwendung der Korrektur nach Ashida berechnet wurde; auf diese Form der Auswertung wurde neuerdings (Hofmeister, 1949) nachdrücklich hingewiesen; sie wurde schon wiederholt verwendet (Hofmeister, 1938; Kreuz, 1941; Rottenburg, 1943), scheint sich aber außerhalb von Wien noch nicht eingeführt zu haben.

Die Permeabilitätsbestimmung nach der Deplasmolysezeit wurde vom Verfasser (l. c.) jüngst als einfaches, zeitsparendes und für vielerlei Zwecke ausreichend genaues Verfahren empfohlen und ihre Anwendbarkeit durch Vergleich mit plasmometrischen Ergebnissen belegt; hier sollen nur die Grundzüge dieser Kurzmethode erwähnt werden, die durch Höfler (1943) an Diatomeen erstmalig zur Anwendung gebracht wurde.

Ausgehend von der Gleichung $P' = \frac{M}{C - c}$, welche von der plasmometrischen Bestimmung her geläufig ist, erfolgt die Berechnung der pro Stunde eindringenden Menge M nach der Überlegung, daß bis zum Augenblick der Deplasmolyse in permeierender Lösung die Differenz zwischen Außenkonzentration des Plasmolytikums und dem osmotischen Wert des Objektes, also C—O, eingedrungen sein muß; dabei ist die Partialkonzentration c des eindringenden Stoffes im Zellsaft von Null bis auf den Wert C—O gestiegen und war zu der halben Deplasmolysezeit etwa halb so groß, nämlich $\frac{C - O}{2}$. Wenn nun $M = \frac{(C - O)\,60}{T}$ in die obige Gleichung eingeführt wird, läßt sich diese in folgender Weise ausdrücken:

[4] Siehe auch S. 77.

[5] Für den Hinweis auf die beiden letztgenannten Objekte und ihre Permeabilitätseigenschaften habe ich Herrn Professor Biebl zu danken, der auch neuerdings dazu anregt (1949), zu zellphysiologischen Studien mehr als bisher Gemüsepflanzen bzw. Nutzpflanzen zu verwenden.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

$$P'_d = \frac{120\ (C - O)}{T\ \ (C + O)}.$$

Demnach kann aus der Deplasmolysezeit T (in Minuten) und aus dem osmotischen Wert der Zellen in Zuckerlösung die Permeationskonstante P′ gefunden werden, welche mit dem plasmometrisch gewonnenen Wert P′ direkt vergleichbar ist, da der Berechnung beider das gleiche Prinzip zugrunde liegt[6]. Einschränkend ist zu erwähnen, daß $P'_d$ dem Durchschnittswert der Permeation vom Einlegen bis zur Deplasmolyse entspricht, während P′ den Wert einzelner Intervalle erfaßt.

Der Vorteil der Deplasmolysezeit-Bestimmung liegt in der Vereinfachung von Versuchsanstellung und Auswertung und in der dadurch bedingten Zeitersparnis, durch welche die Möglichkeit zu breiterer Versuchsanstellung gegeben ist, ferner darin, daß das Verhalten der vielen Zellen eines ganzen Schnittes im Durchschnitt erfaßt wird. In der oben erwähnten Darstellung ist an Beispielen gezeigt, daß diese Werte bei gleichmäßiger Permeation mit den plasmometrisch gewonnenen gut übereinstimmen; die Genauigkeit der Bestimmung ist für die Ziele der vorliegenden Abhandlung mehr als ausreichend.

Die Versuche wurden nach einem einheitlichen Schema durchgeführt, wobei einfachste Versuchsbedingungen angestrebt wurden. Farbstoff und Plasmolytika wurden in Brunnenwasser (aus Purkersdorf bei Wien) gelöst, welches nach mehrtägigem Stehen in verschlossener Flasche $p_H$ 7,5 zeigte[7]. Die mit diesem Wasser in der Konzentration 1 : 10.000 angesetzte Farbstofflösung gab zufriedenstellende, deutlich sichtbare Färbung des Plasmas bei allen Objekten. Die Färbungsdauer war durch die Forderung begrenzt, daß die Zellen den Permeabilitätsversuch auch im gefärbten Zustand zumindest überleben mußten. Die Verwendung von Pufferlösungen (n/150 Phosphatpuffer nach Strugger, 1938) erwies sich trotz der starken Verdünnung als ungünstig, da zwar die Plasmafärbung bei bestimmter Wasserstoffionenkonzentration (s. S. 59) intensiver war als in Brunnenwasser, die gemeinsame Wirkung von Puffer, Färbung und Diosmotikum aber vor Ende des Permeationsversuches zum Tode oder zu deutlicher Schädigung der Zellen führte.

Von frisch eingebrachtem Material wurde jeweils eine Anzahl vergleichbarer Schnitte angefertigt und zu einem Teil in Wasser, zum anderen in Farblösung gelegt. Direkt verglichen werden nur die gleichzeitig präparierten Schnitte von derselben Pflanze; diese streng vergleichbaren Versuche sind in den Tabellen jeweils zwischen zwei Linien eingeschlossen. Der Kontrollwert K (im gleichen Plasmolytikum an ungefärbten Zellen gemessen) wird gleich 100 gesetzt und die anderen, unter dem Einfluß von Färbung, Wässerung usw. erhaltenen P′-Werte der Serie werden in % der Kontrolle ausgedrückt, wie dies von Bogen (1941) geübt wurde. Eine weitere statistische Bearbeitung der Resultate, wie sie Bogen durchführt, wird nicht vorgenommen, da die Zahl der Versuche zu gering ist. Die Ergebnisse sind jedoch dadurch genügend gesichert, daß besonders in den Deplasmolysezeit-Versuchen die vielen Zellen

[6] Der Index d soll angeben, daß der Wert das Ergebnis eines Deplasmolysezeit-Versuches ist.

[7] Das Wiener Leitungswasser wird seit Kriegsende mit Chlor versetzt: zur Zeit, in der diese Versuche durchgeführt wurden, konnte auch destilliertes Wasser nicht in entsprechender Reinheit und Menge hergestellt werden. Wenn solches verwendet ist, ist es eigens vermerkt — es handelt sich dann um Purkersdorfer Wasser, das einmal aus Jenaer Glas destilliert wurde.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

des ganzen Schnittes erfaßt sind und daß die gewerteten Permeabilitätsverschiebungen mit zwei Ausnahmen einheitlich in dieselbe Richtung gehen. Bei Versuchen, die nicht Harnstoff betreffen, gibt die Höhe eines für das betreffende Material gemessenen Harnstoffversuches einen Anhaltspunkt für die Beurteilung des Materials.

Um den Einfluß der Färbung auch während des Permeationsversuches zu erhalten, kamen die Schnitte nach Vorfärbung von verschiedener Dauer in kombinierte Lösung von Diosmotikum + Farblösung. Die kürzeste Einwirkung der Färbung kam also durch direktes Einlegen in die kombinierte Lösung zustande.

Gelegentlich mußten eigens Kontrollversuche an Schnitten angestellt werden, die durch viele Stunden gewässert worden waren, um den Einfluß vielstündiger Färbung nicht etwa mit dem ebensolanger Wässerung zu verwechseln.

Die Reversibilität der Färbung und der durch sie hervorgebrachten Plasmaveränderungen wurde an Schnitten festgestellt, aus denen durch Dauerwässerung der Farbstoff wieder entfernt worden war — wir werden diese Versuchstype weiterhin der Kürze halber „Exosmoseversuche" nennen; auch zu diesen Versuchen war der Vergleich mit entsprechend lang gewässerten Kontrollschnitten nötig.

## III. Versuche mit Narcissus pseudonarcissus L.

Objekt und Präparation. Verwendet wurden Zellen der oberen (inneren) Epidermis aus der Äquatorgegend der (von außen) dritten Zwiebelschuppe. Die Pflanzen trugen vollentwickelte Blätter und, mit Ausnahme der ersten, auch Blüten; die Versuche fallen zwischen 20. März und 13. April 1946. Ein Zwiebelsektor wurde herausgeschnitten und in Wasser entlüftet; die Schuppen lösten sich dann leicht voneinander, und die obere Epidermis ließ sich mühelos abheben bzw. blieb überhaupt auf der Außenseite der nächstinneren Schuppe liegen. Sie wurde dann, auf Wasser schwimmend, mit einem Scherchen zerschnitten. Die untersuchten Zellen sind reich an Plasma und zeigen lebhafte Zirkulationsströmung. Bei aufgeblühten Pflanzen scheint die Plasmamenge etwas geringer zu sein als bei treibenden.

Vitalfärbung mit Chrysoidin. Nach Färbung von einer bis zu mehreren Stunden Dauer in der Chrysoidinlösung 1 10.000 zeigt nur das Plasma diffuse, kräftige Gelbfärbung[8], nach längerer Dauer wird auch der Zellsaft leicht gelb, die Membranen bleiben ungefärbt. Die Kerne zeigen glatte Kontur und sind klar durchsichtig — ob sie gefärbt sind, kann nicht festgestellt werden.

[8] In orientierenden Versuchen mit Puffern zwischen $p_H$ 7,1 und 10,1 fand ich Plasmafärbung von 7.1 aufwärts, am schönsten und stärker als in Leitungswasser bei $p_H$ 7,45 und 8,0. Membran und Zellsaft waren oberhalb 7,1 nicht oder minimal gefärbt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Nach 2 bis $2^1/_2$ Stunden quillt das gefärbte Plasma und sammelt sich an den Zellenden nach Art von Vakuolenkontraktion, wobei es insgesamt etwa 20 bis 30% der Zellen einnimmt; die Volumsvermehrung des Plasmas steht unzweifelhaft fest und ist nicht etwa nur durch Verlagerung vorgetäuscht, wie dies Strugger (1936 a) für Allium und Neutralrot schildert. In dem verquollenen Plasma scheint die diffuse Färbung geringer zu sein als vorher, dagegen befinden sich jetzt stark angefärbte Lipoidtröpfchen darin, neben denen noch andere, ungefärbte Körnchen und Tröpfchen im Plasma liegen. Diese Lipoidtröpfchen dürften, wenigstens zum Teil, schon vorher in farblosem Zustand vorhanden sein, nehmen jedoch bei längerer Färbungsdauer oder bei Plasmolyse an Zahl und Größe zu, wobei offenbar kleinere, vorher nicht sichtbare Tröpfchen zu größeren verschmelzen. Wulff (1934) findet, daß Chrysoidin zunächst nur die Lipoide anfärbt. Drawert (1940) gibt an, daß der Farbstoff aus Lösungen von $p_H$ 5 bis 11,5 zur Gänze in Toluol oder in Toluol + Ölsäure übergeht, ebenso von 6 bis 11,5 in Chloroform. Die gefärbten Tröpfchen fand ich in Alkohol und in Azeton unlöslich, in Äther dagegen leicht löslich, was für ihre Lipoidnatur spricht.

Verlauf der Permeabilitätsversuche. In 1,0 mol Harnstoff plasmolysieren die ungefärbten Protoplaste von Narcissus mit konvexen Formen, nach etwa 50 Minuten sind sie vollkommen gerundet. Die Zellen sind reich an Plasma, das in zahlreichen Strängen die Vakuole durchzieht, lebhafte Zirkulationsströmung zeigt und viele kleine Körnchen und Lipoidtröpfchen enthält. Nach beendeter Rückdehnung sieht man Systrophe, Plasmaraumgitter und sonstige Erscheinungen, welche guten Lebenszustand der Zellen anzeigen.

Ausgiebig gefärbte Zellen zeigen bei Harnstoffplasmolyse viel raschere Rundung als die ungefärbten (Viskositätsverminderung). Wenn Vakuolenkontraktion vorliegt, tritt die Plasmolyse sofort als Kappenplasmolyse ein; das Volumen des gequollenen Plasmas nimmt in 1,0 mol Harnstoff zunächst um etwa 40% ab, um dann während der Deplasmolyse wieder ein wenig anzuwachsen. Wenn nach kürzerer Vorfärbung (weniger als zwei Stunden) das Plasma noch nicht gequollen ist, also noch keine Vakuolenkontraktion vorliegt, treten die Kappen erst auf, wenn die entsprechende Färbungsdauer erreicht ist, wobei die Harnstoffplasmolyse keine oder verzögernde Wirkung ausübt. Nach langdauernder Harnstoffplasmolyse ist das Kappenplasma stark vakuolisiert[9].

[9] In orientierenden Versuchen mit gepufferter Chrysoidinlösung (s. auch S. 59) gab es bei $p_H$ 8 starke Diffusfärbung des Plasmas (keine gefärbten

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

In farbloser Harnstofflösung vermindert sich die Färbung nach und nach, und die Protoplaste nähern ihr Verhalten bezüglich Permeabilität und Aussehen schließlich dem ungefärbter Zellen. Schnitte, die in „Exosmoseversuchen" (siehe S. 59) durch Wässerung von mehr als drei Stunden wieder völlig entfärbt wurden, zeigten langsame Rundung beim Plasmolyseeintritt, Plasmastränge und Systrophe und auch dieselbe Permeabilität wie ungefärbte.

Die Permeabilität vitalgefärbter Zellen. Vitalfärbung mit Chrysoidin verursacht bei Narcissus eine Steigerung der Harnstoffpermeabilität. Nach Färbung von 50 Minuten bis zu 5 Stunden (Vers. Nr. 12 bis 15) fand ich in farbloser Harnstofflösung Permeabilität von 220, 241 und 346% der Kontrolle[10]. In der kombinierten Lösung von 1,0 Harnstoff + 1 : 10.000 Chrysoidin (Vers. Nr. 16 und 37) ergab sich Erhöhung auf 540 und 462% der Kontrolle[11].

Eine Proportionalität zwischen der Größe der Permeabilitätsänderung und der Färbungsdauer ist nicht gegeben. Schon Schaede (1923) stellte fest, daß die Speicherung des Chrysoidins aus verschiedenen Konzentrationen immer nur bis zu einem gewissen Grade geht und nicht etwa bis zu einem für alle Konzentrationen gleichen Maximum getrieben wird. Die volle Färbungsintensität ist in unserem Falle schon nach etwa einer Stunde erreicht, die fragliche Abhängigkeit könnte also nur bei kürzeren Färbezeiten gefunden werden; sie müßte aber durch den unvermeidlichen Einfluß der Entfärbung oder der weiteren Färbung im Permeabilitätsversuch verwischt werden, je nachdem, ob das Diosmotikum allein oder zusammen mit dem Farbstoff geboten wird. Dagegen wäre aus verschiedenen Farbstoffkonzentrationen verschieden starke Anfärbung und als Folge davon verschieden hohe Permeabilität denkbar. In diese Richtung verweisen auch einige Versuche mit Pufferlösungen, die hier nicht mitgeteilt sind.

Wie schon mit dem Nachlassen der Färbung die Permeabilitätsveränderung geringer wird, bringt vollständige Entfärbung die Wiederherstellung der ursprünglichen Durchlässigkeit. Die Schnitte der Exosmoseversuche Nr. 20 und 36, die mit 4 Std. 25 Min. und 2 Std. 25 Min. genügend lange gefärbt wurden, geben nach drei-

Tröpfchen) und in derselben Lösung + 1,0 mol Harnstoff viele Myelinfiguren, die sich in den Zellsaft erstreckten. Von diesen Zellen wurde der Permeationsversuch nicht mehr ertragen.

[10] Über das Prinzip der Auswertung s. S. 58.

[11] Aufeinanderfolgende Messungsintervalle zeigen in ungefärbter Lösung zum Teil fallende Tendenz, in der kombinierten Lösung steigende, was auf den schwindenden bzw. verstärkten Einfluß der Färbung zurückgehen dürfte.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

stündigem Auswässern mit 102 und 158% der Kontrolle denselben bzw. einen nur wenig höheren Wert als die Kontrolle; auch Versuch 40, dessen Schnitt nur 15 Minuten nachgewässert wurde, ist mit 174% der Kontrolle nicht mehr stark erhöht. Alle drei Werte liegen niedriger als die sonst an gefärbten Schnitten gefundenen. Die Kontrollen (Vers. Nr. 21 und 38) wurden annähernd ebensolange gewässert wie die Versuche selbst, um etwaigen Einfluß der Dauerwässerung auszugleichen.

Tabelle 1.

Narcissus pseudonarcissus L., obere Epidermis der Zwiebelschuppen[12].

Farblösung: Chrysoidin 1 : 10.000. — In der Spalte „Farbstoff" bedeutet O = 1,0 mol Harnstoff und F = 1,0 mol Harnstoff + 1 : 10.000 Chrysoidin. — Streng vergleichbare Versuche sind durch waagrechte Striche eingeschlossen. — K = 100 gilt für den Wert des Kontrollversuches am ungefärbten Schnitt und im farblosen Plasmolytikum.

| Dauer der | | | Farbstoff | P' | % der Kontrolle | Datum 1946 | Vers.-Nr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Wässerung | Vorfärbung | Wässerung nach Färbung | | | | | |
| 15 Min. | 50 Min. | — | O | 0,325 | 346 | 23. III. | 12 |
| 15 Min. | 1 Std. 45 M. | — | O | 0,207 | 220 | | 13 |
| 15 Min. | 5 Std. 06 M. | — | O | 0,226 | 241 | | 15 |
| 2 Std. 43 M. | — | — | O | 0,094 | K = 100 | „ | 14 |
| 20 Min. | 1 Std. | — | F | 0,540[14] | 540 | 25. III. | 16 |
| 5 Std. | — | — | O | 0,100 | K = 100 | „ | 19 |
| 8 Std. 10 M. | — | — | O | 0,053 | K = 100 | 26. III. | 21 |
| 15 Min. | 4 Std. 25 M. | 3 Std. 30 M. | O | 0,054 | 102 | „ | 20 |
| 6 Std. 46 M. | — | — | O | 0,026 | K = 100 | 13. IV. | 38 |
| — | 2 Std. 55 M. | 15 Min. | O | 0,045 | 174 | | 40 |
| — | 2 Std. 25 M. | 3 Std. 07 M. | O[13] | 0,041 | 158 | | 36 |
| — | 5 Std. 40 M. | — | F | 0,120[14] | 462 | | 37 |

[12] Über Objekt und Methode s. S. 59, die Berechnung S. 57 f.

[13] In diesem einen Fall dest. Wasser als Lösungsmittel.

[14] Durchschnitt von 2 Intervallen, die Permeabilitätsanstieg während des Versuches zeigten.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Als Anhang seien einige Beobachtungen in Prune pure erwähnt, die an diesem Objekt gemacht wurden. Dieser Farbstoff färbte (wenigstens in ungepufferter Lösung) ziemlich ungleichmäßig; die Färbung war in Wundnähe stärker und von einem Schnitt zum andern nicht voll reproduzierbar; Ähnliches erwähnt Schaede (1924). Ich fand bei Narcissus die schönste Plasmafärbung bei $p_H$ 7,5 bis 8,0, dabei war der Zellsaft fast nicht und die Membran schwach gefärbt. Bei $p_H$ 8,8 und 10,1 war die Harnstoffpermeabilität durch die Färbung stark erniedrigt, die Randzellen zeigten Plasmakappen und waren anders gefärbt als der übrige Schnitt. Schädigung war noch nach vielen Stunden nicht festzustellen. Wenn der Farbstoff in Brunnenwasser geboten wurde, blieb die Färbung sehr gering, und die Permeabilität war unverändert.

## IV. Versuche mit Solanum tuberosum L.

Zellen und Präparation. Von der Kartoffelpflanze verwendete ich die Epidermiszellen des Blattstieles. Ich wählte das (von oben gezählt) fünfte vollentwickelte Fiederblatt und entnahm einen Epidermisstreifen von der äußeren, konvexen Fläche des Blattstieles durch Einschneiden und darauffolgendes Abheben des Streifens, der nicht unter Verbiegen „abgerollt", sondern unter leichter Spannung abgezogen wurde. Meist haften 1 bis 2 Schichten lebender Parenchymzellen an der abgezogenen Epidermis, und alle Zellen leben ohne Zeichen einer Schädigung. Anschließend wurden die Epidermisstreifen entlüftet und dann so weiterbehandelt, wie es bei Narcissus beschrieben ist.

Vitalfärbung mit Chrysoidin. In der Chrysoidinlösung ist nach 2 bis 3 Stunden die Kutikula stark gelb gefärbt, wobei insbesondere die warzenförmigen Verdickungen der Kutikula durch ihre Färbung hervorstechen. Die Membranen und der Zellsaft bleiben farblos. Das Plasma zeigt diffuse Gelbfärbung und enthält daneben viele gelbe Körnchen oder Tröpfchen. Nach längerer Färbung ist auch der Zellsaft leicht gefärbt, doch ist dieses Stadium schon mit Schädigung im Permeabilitätsversuch verbunden.

Bei Solanum ruft Chrysoidin weder Vakuolenkontraktion noch Plasmaquellung hervor; die noch zu beschreibenden Kappenplasmolysen, die an gefärbten und ungefärbten Schnitten in Harnstoff oder Methylharnstoff auftreten, gehen auf die alleinige Rechnung dieser Stoffe.

Die Vitalfärbung ist hier völlig reversibel. Im Exosmoseversuch wurde $2^1/_2$ Stunden gefärbt und anschließend 22 Std. 24 Min. gewässert (Versuch 86), worauf keine Spur mehr von der vorangegangenen Färbung zu erkennen war.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Verlauf der Permeabilitätsversuche. Bei Solanum wurde die Mehrzahl der Permeabilitätsbestimmungen nach der Deplasmolysezeit vorgenommen.

In 1,0 mol Harnstoff trat die Plasmolyse ungefärbter Zellen schnell und mit runden Formen ein; schon nach $4^1/_2$ Minuten waren die Zellen infolge der hohen Permeabilität wieder deplasmolysiert. In 1,5 mol Harnstoff vergehen 6 Minuten bis zur Deplasmolyse[15]. Neuerliche Plasmolyse in Zuckerlösung (1,0 mol) zeigt alle Zellen lebend.

Von anderen Plasmolyticis war Malonamid nicht ganz unschädlich, Erythrit und Glyzerin wurden sehr gut vertragen und Plasmaquellung tritt darin nicht auf. Äthylenglykol dringt sehr rasch ein und schädigt.

Plasmaquellung. In 2,0 mol Harnstoff geschieht die plasmolytische Abhebung rasch und die Vakuole nimmt sofort runde Form an. Dagegen umgibt das Plasma noch 3 Minuten nach dem Einlegen in die Harnstofflösung den Tonoplasten mit unregelmäßiger Außenkontur. Anschließend wird es flüssig, rundet sich, quillt kräftig auf und wird durch die Vakuole von den Längswänden nach den Menisken gedrängt, so daß Kappenplasmolyse zustande kommt. In den Plasmakappen, die schließlich bis zu einem Drittel der Zelle einnehmen können, bilden sich zahlreiche Vakuolen, die platzen und miteinander verschmelzen können. Auch diese Zellen sind wenigstens zum Teil neuerlich plasmolysierbar.

Auch in Zuckerlösung vermag das Plasma der Kontraktion der Vakuole nicht sofort zu folgen und bleibt z. B. in 1,0 mol Laevulose wenigstens in den Randzellen noch stundenlang mit unregelmäßiger Begrenzung an den Menisken angehäuft, um sich dann erst gleichmäßig über den ganzen Protoplasten zu verteilen.

Die Erscheinung in Harnstoff ist als Plasmoschise plasmolysierter Protoplaste zu betrachten, wie sie Küster (1926 S. 92) abbildet, wobei das Plasma, in seinen äußeren Partien etwas verfestigt, erstarrt, der Kontraktion der Vakuole zunächst nicht zu folgen vermag. In der langsam permeierenden Zuckerlösung hat dies weiter keine Folgen, in der rapid eindringenden Harnstofflösung dagegen findet Überschwemmung des Plasmas durch die Lösung, mächtige Aufquellung und Vakuolenbildung statt.

[15] Diese Angaben gelten nicht für die 3—4 Zellreihen am Schnittrand, welche die von verschiedenen Objekten bekannte Permeabilitätshemmung an Wundrändern zeigten (Höfler und Stiegler, 1921, 1930); Biebl (1948) findet bei unserem Objekt Herabsetzung der Durchlässigkeit wundnaher Zellen bis auf $^1/_{10}$ der normalen Permeabilität.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Auch in Methylharnstoff (1,0 mol) treten sehr bald derartige Plasmakappen auf, was bereits Biebl (1948) für das gleiche Objekt beschrieben hat. Die Zellen lebten nach der Deplasmolyse noch und waren in Laevulose neuerlich plasmolysierbar.

Die Harnstoff- und Methylharnstoffpermeabilität des gequollenen Plasmas bleibt dieselbe wie in niedrigeren Konzentrationen, in denen Quellung nicht zustande kommt, was auch Biebl (l. c.) für Methylharnstoff bereits feststellen konnte.

Die gefärbten Zellen zeigen eine leichte Viskositätserhöhung, die in einer Erstarrung des Plasmas zum Ausdruck kommt. So bleiben nach Färbung von 2 Stunden (die ohne weitere Schädigung ertragen wird) bei Plasmolyse in 1,0 mol Harnstoff wurmförmige Plasmagebilde an den Protoplastenenden, die erst allmählich eingezogen und über die Oberfläche verteilt werden. Nach Färbung von $4^1/_4$ Stunden war der Plasmolyseeintritt konkav und der Permeabilitätsversuch wurde nicht mehr ohne Schädigung ertragen. Plasmaquellung durch Harnstoff kommt auch in den gefärbten Zellen vor und tritt da schon in der Konzentration von 1,0 mol auf, in der sie bei ungefärbten Zellen noch nicht zustande kommt. In diesem Falle entstanden die Kappen jedoch erst nach etwa 35 Minuten, gegenüber 4—5 Minuten in 1,5 mol Harnstoff und ungefärbten Zellen. Diese Kappenbildung in der niedrigeren Harnstoffkonzentration steht nur insoferne mit der Wirkung des Chrysoidins in Zusammenhang, als dieses die Harnstoffdurchlässigkeit stark herabsetzt und so eine vielfach verlängerte Einwirkungszeit der Harnstofflösung bewirkt (Deplasmolysezeit von 1 Stunde statt $4^1/_2$ Minuten). Abhängigkeit der Kappenbildung von der Dauer der Einwirkung des Methylharnstoffs stellte Biebl (l. c.) bereits fest.

Die Permeabilität vitalgefärbter Zellen. Die Harnstoffpermeabilität unbehandelter Zellen geht aus den Versuchen Nr. 49 bis 57 der Tabelle 2 hervor (P′ im Mittel 13,9). Bei gefärbten Zellen ist sie bedeutend herabgesetzt, so in den Versuchen Nr. 48 und 58 nach Färbung von 3 Std. 20 Min. bzw. 4 Std. 13 Min. auf 25 und 13% der Kontrolle, dasselbe zeigen die Versuche Nr. 65, 67, 75, 82, 84 mit Färbezeiten zwischen 42 Minuten und 5 Std. 20 Min. und Permeabilität zwischen 7 bis 20% der Kontrolle. Auch dann, wenn in kombinierter Lösung die Färbung erst zugleich mit der Plasmolyse einsetzt, ist die Permeation erniedrigt (Vers. Nr. 64 und 66 mit 47 bzw. 16% der Kontrolle). Proportionalität zwischen Permeation und Färbungsdauer ergibt sich hier ebensowenig wie bei Narcissus.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at



Tabelle 2. Solanum tuberosum L., Epidermiszellen des Blattstieles.

Material I und II: Material I, zwischen 29. VI. und 3. VII. untersucht, hat eine Harnstoffpermeabilität um 14 bis 16, dagegen Material II, das nach dem 9. VII. verwendet wurde, eine unter 10. Es handelt sich um verschiedene Pflanzen, außerdem wurde der sehr trockene Sommer 1946 zwischen 3. und 9. VII. durch einige Regentage unterbrochen, die vielleicht ähnlich wirkten wie Dauerwässerung (s. S. 68). Durchgehend können also nur die Werte von % der Kontrolle, aber nicht die von P′ verglichen werden. — Farbstoffkonzentration: 1 : 10.000 Chrysoidin. — Lösungsmittel: Brunnenwasser, nur am 29. VI. dest. Wasser. — In der Spalte „Farbstoff" bedeutet O ungefärbtes Plasmolytikum und F kombinierte Lösung (Plasmolytikum gelöst in 1 : 10.000 Chrysoidin). Kursiv: Plasmometrische Werte.

| Material | Plasmolytikum | | Farbstoff | Dauer der | | | $P'_d$ | | % der Kontrolle | Vers.-Nr. | Datum 1946 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Substanz | mol | | Wässerung | Vorfärbung | Wässerung nach Färbung | | | | | |
| I | Harnstoff | 1,0 | O | 1 Std. 15 M. | — | — | 11,6 | Mittel 13,9 | Mittel K = 100 | 49 | 29. VI. |
| | | 1,0 | O | 1 Std. 15 M. | — | — | 16,6 | | | 50 | |
| | | 1,0 | O | 1 Std. 30 M. | — | — | 12,9 | | | 51 | |
| | | 1,0 | O | 1 Std. 40 M. | — | — | 14,5 | | | 52 | |
| | | 1,0 | O | 1 Std. 47 M. | — | — | 17,9 | | | 53 | |
| | | 1,2 | O | 3 Std. 16 M. | — | — | 13,2 | | | 54 | |
| | | 1,2 | O | 3 Std. 50 M. | — | — | 13,2 | | | 55 | |
| | | 1,5 | O | 4 Std. | — | — | 12,5 | | | 56 | |
| | | 1,5 | O | 4 Std. 10 M. | — | — | 12,5 | | | 57 | |
| | | 1,2 | O | — | 3 Std. 20 M. | — | 3,47 | | 25 | 48 | |
| | „ | 1,2 | O | — | 4 Std. 13 M. | — | 1,83 | | 13 | 58 | |
| I | Harnstoff | 1,0 | O | 45 Min. | — | — | 14,6 | | K = 100 | 63 | 1. VII. |
| | | 1,0 | F | 1 Std. | — | — | 6,8 | | 47 | 64 | |
| | | 1,0 | F | 3 Std. 25 M. | — | — | 2,3 | | 16 | 66 | |
| | | 1,0 | F | — | 2 Std. | — | 1,1 | | 7 | 65 | |
| | „ | 1,0 | F | — | 5 Std. 20 M. | — | 1,83 | | 13 | 67 | |
| I | Harnstoff | 1,0 | O | 2 Std. 53 M. | — | — | 16,9 | Mittel 15,2 | Mittel K = 100 | 77a | 2. VII. |
| | | 1,0 | O | 3 Std. 22 M. | — | — | 13,5 | | | 78 | |
| | | 1,0 | O | 4 Std. 30 M. | — | — | 13,5 | | | 78a | |
| | | 1,0 | O | 6 Std. | — | — | 16.9 | | | 81 | |
| | | 1,0 | F | — | 1 Std. 32 M. | — | 1,5 | | 10 | 75 | |

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at



| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | Harnstoff | 1,0 | F | 6 Std. 10 M. | 42 Min. | — | 3,1 | 20 | 82 | 2. VII. |
| | | 1,0 | F | 6 Std. 10 M. | 1 Std. 29 M. | — | 1,1 | 7 | 84 | |
| | | 1,0 | O | 23 Std. 50 M. | — | — | 6,76 | K = 100 | 88 | 2. bis 3. VII. |
| | „ | 1,0 | O | — | 2 Std. 30 M. | 22 Std. 24 M. | 6,76 | 100 | 86 | |
| II | Harnstoff | 1,0 | O | 7 Std. 45 M. | — | — | 4,97 | — | 110 | 9. VII. |
| | Glykol | 2,0 | O | 5 Std. 50 M. | — | — | 13,6 Mittel | Mittel | 107 | |
| | | 2,0 | O | 5 Std. 50 M. | — | — | 10,6 12,1 | K = 100 | 107 | |
| | | 2,0 | O | 7 Std. 25 M. | 1 Std. | — | 14,1 | 116 | 114 | |
| | „ | 2,0 | O | 7 Std. 25 M. | 1 Std. 30 M. | — | 19,0 | 157 | 115 | |
| II | Harnstoff | 1,0 | O | 1 Std. 45 M. | — | — | 9,6 | — | 122 | 10. VII. |
| | Glyzerin | 1,0 | O | 5 Std. 12 M. | — | — | 0,52 Mittel | Mittel | 126a | |
| | | 1,0 | O | 7 Std. | — | — | *0,43* 0,48 | K = 100 | 130 | |
| | | 1,0 | F | 25 Min. | — | — | 1,98 | 413 | 119 | |
| | „ | 1,0 | F | 5 Std. 23 M. | 1 Std. 37 M. | — | *0,46* | 96 | 129 | |
| II | Harnstoff | 1,0 | O | — | — | — | 6,6 | — | 145 | 20. VII. |
| | „ | 1,0 | O | — | — | — | 9,6 | — | 156 | |
| | Methylharnstoff | 1,0 | O | — | — | — | 9,9 | nicht gewertet | 146 | |
| | | 1,0 | O | — | — | — | 10,7 | | 153 | |
| | | 1,0 | F | — | — | — | 4,3 | | 151 | |
| | | 1,0 | F | — | — | — | 9,3 | | 155 | |
| | „ | 1,0 | F | — | 2 Std. | — | *10,3* | | 150 | |
| | Malonamid | 0,8 | O | — | — | — | *0,25* | Mittel | 149 | |
| | | 0,8 | O | — | — | — | *0,14* Mittel | K = 100 | 152 | |
| | | 0,8 | F | — | — | — | *0,28* 0.20 | 140 | 154 | |
| | „ | 0,8 | F | — | 53 Min. | — | *0,26* | 130 | 148 | |
| II | Erythrit | 0,8 | O | — | — | — | nur Exosmose von Zellsaftstoffen geringe Dehnung | — | 164 | 26. VII. |
| | „ | 0,8 | F | — | 48 Min. | — | | — | 166 | |
| | Plasmolyse-eintritt in | | | | | | Plasmolyseeintrittszeit als Maß der WP | | | |
| II | Laevulose | 0,6 | O | — | — | — | 6 bis 8 Min. | | 159 bis 162 | 26. VII. |
| | „ | 0,6 | O | — | 4 Std. 20 M. | — | 6 bis $7^1/_2$ Min. | | 163 | |
| | Erythrit | 0,8 | O | — | — | — | $3^1/_2$ bis 5 Min. | | 168 | |
| | | 0,8 | O | — | 2 Std. | — | $3^1/_2$ bis 5 Min. | | 167 | |

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Wässerung bis zu 6 Stunden Dauer hat keinen nennenswerten Einfluß auf die Durchlässigkeit (Vers. Nr. 77 a, 78, 78 a und 81 mit P′ von 15,2 im Mittel), so daß die Herabsetzung der Permeation auf alleinige Rechnung der Färbung zu setzen ist.

Völlige Angleichung an die Permeabilität ungefärbter Zellen nach dem Verschwinden der Färbung zeigt ein Exosmoseversuch, in dem nach Färbung von 2 Std. 30 Min. und anschließender Wässerung von 22 Std. 24 Min. der völlig entfärbte Schnitt in Harnstoff denselben Wert gab wie die etwa gleichlang gewässerte Kontrolle (Nr. 86, 88). Absolut ist der P′-Wert des Kontrollversuches Nr. 88 nur halb so hoch wie der streng vergleichbarer Versuche an Teilen des gleichen Epidermisstreifens (Nr. 77 a, 78, 78 a, 81), die nur 3 bis 6 Stunden gewässert wurden, was auf die Wässerung von 23 Std. 50 Min. Dauer zurückgeht. Biebl (l. c.) fand bei seinem Kartoffelmaterial die Harnstoffpermeabilität erst durch Wässerung von mehr als 28 Stunden herabgesetzt.

In Malonamid zeigten die ungefärbten Schnitte Zeichen von Schädigung, während die gefärbten in gutem Zustand blieben; es dringt in gefärbte ein wenig schneller ein (Vers. Nr. 148, 149, 152, 154). Für Methylharnstoff ist aus den wenigen Versuchen keine Beeinflussung durch die Färbung zu entnehmen.

Die Glyzerinpermeabilität war bei kurzer Färbung (in kombinierter Lösung, Vers. Nr. 199) mit 413% der Kontrolle kräftig erhöht und in Vers. Nr. 129 nach Vorfärbung von 1 Std. 37 Min. jedenfalls nicht erniedrigt. In Erythrit, der sehr langsam permeiert, zeigt der ungefärbte Schnitt keine Rückdehnung, die Exosmose von Zellsaftstoffen überwiegt; die geringe Ausdehnung im gefärbten Schnitt läßt immerhin auf eine etwas erhöhte Permeabilität schließen.

Beeinflussung der Wasserpermeabilität durch Chrysoidin scheint nicht vorzuliegen, da der Plasmolyseeintritt in Laevulose und in Erythrit bei gefärbten und ungefärbten Schnitten (unbeschadet verschieden rascher Rundung) gleich schnell war (Vers. Nr. 159 bis 163, 167, 168).

## V. Versuche mit Daucus carota L.

Zellen und Präparation. Ein schätzenswertes Objekt für zellphysiologische Arbeiten sind die Epidermiszellen des Blattstieles der Karotte (Biebl, 1948 b); ich arbeitete mit jungen Pflanzen, die nur grundständige Blätter hatten. Die Präparation erfolgte ebenso, wie es weiter oben für die Blattstielepidermis der Kartoffel beschrieben ist; die abgezogenen Epidermisstreifen waren beiderseits von Kollenchymstreifen begrenzt und so während der

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at



Tabelle 3. *Daucus carota* L., Epidermiszellen des Blattstieles.

Material I und II: Vor und nach dem 9. VII. wurden verschiedene Versuchspflanzen verwendet; siehe zu diesem Punkt die Vorbemerkung zu Tabelle 2, S. 66. Farbstoffkonzentration: 1:10.000 Chrysoidin. — Lösungsmittel: Brunnenwasser. — In der Spalte „Farbstoff" bedeutet O ungefärbtes Plasmolytikum und F kombinierte Lösung (Plasmolytikum gelöst in 1:10.000 Chrysoidin). Kursiv: Plasmometrische Werte.

| Material | Plasmolytikum | | Farbstoff | Dauer der | | | $P'_a$ | % der Kontrolle | Vers.-Nr. | Datum 1946 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Substanz | mol | | Wässerung | Vorfärbung | Wässerung nach Färbung | | | | |
| I | Harnstoff | 1,2 | O | — | — | — | 2,72 | — | 59 | 29. VI. |
| I | Harnstoff | 1,0 | O | 7 Std. 43 M. | — | — | 0,97 | K = 100 | 70 | 1. VII. |
| | „ | 1,0 | F | 5 Std. 49 M. | — | — | 0,50 | 52 | 69 | |
| I | Harnstoff | 1,0 | O | 2 Std. 53 M. | — | — | 3,74 | — | 77b | 2. VII. |
| | | 1,0 | O | 5 Std. 56 M. | — | — | 2,2 | K = 100 | 81a | |
| | | 1,0 | F | 2 Std. 13 M. | 2 Std. 33 M. | — | 0,9 | 41 | 79 | |
| | | 1,0 | O | — | 2 Std. 30 M. | 4 Std. 53 M. | 1,31 | 60 | 74 | |
| | | 1,0 | O | 23 Std. 50 M. | — | — | 0,69 | K = 100 | 89 | 2. bis 3. VII. |
| | „ | 1,0 | O | — | 2 Std. 30 M. | 22 Std. 24 M. | 0,62 | 90 | 87 | |
| II | Harnstoff | 1,0 | O | 1 Std. 25 M. | — | — | 7,85 } Mittel 7,3 | K = 100 | 102 | 9. VII. |
| | | 1,0 | O | 2 Std. 30 M. | — | — | 6,8 | | 105 | |
| | | 1,0 | F | 2 Std. 30 M. | — | — | 1,75 | 24 | 104 | |
| | | 1,0 | F | — | 1 Std. 08 M. | — | 1,79 | 25 | 99 | |
| | „ | 1,0 | F | — | 1 Std. 48 M. | — | 2,1 | 29 | 103 | |
| | Glykol | 2,0 | O | 8 Std. 20 M. | — | — | 11,6 } Mittel 14,6 | K = 100 | 111 | |
| | | 2,0 | O | 8 Std. 25 M. | — | — | 17,5 | | 112 | |
| | | 2,0 | O | 7 Std. 25 M. | 1 Std. 05 M. | — | 20,2 | 138 | 113 | |
| | „ | 2,0 | O | 7 Std. 25 M. | 1 Std. 30 M. | — | 19,4 | 133 | 116 | |
| II | Harnstoff | 1,0 | O | 1 Std. 45 M. | — | — | 8,9 | — | 121 | 10. VII. |
| | Glyzerin | 1,0 | O | 6 Std. 55 M. | | — | 0,65 | K = 100 | 127 | |
| | | 1,0 | F | 25 Min. | — | — | 0,57 | 88 | 120 | |
| | | 1,0 | F | 5 Std. 23 M. | 1 Std. 37 M. | — | *0,48* | 74 | 128 | |

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Präparation vor Zerrung gut geschützt — es kamen die Epidermiszellen zwischen den engerstehenden Kollenchymstreifen in Verwendung.

Vitalfärbung mit Chrysoidin. Nach einstündiger Färbung ist das Plasma von Daucus diffus gefärbt und enthält außerdem viele gelbe Körnchen oder Tröpfchen; der Zellsaft ist nicht oder kaum und die Membran nur schwach gefärbt. Nach langdauernder Färbung treten im Zellsaft gefärbte Krümel auf, die sich darin zu dendritenförmigen, lockeren Bildungen aneinanderlegen, ohne daß diesen Gebilden eine vorher gegebene Struktur entspräche. Nach vierstündiger Färbung fand ich Plasma und Zellsaft kräftig gelb, die Zellen waren noch plasmolysierbar, doch blieb das Plasma an den Protoplastenenden in Gestalt wurmförmiger Fortsätze (ähnlich wie bei Solanum) stehen (Viskositätserhöhung), und die Protoplaste starben im Permeabilitätsversuch vor Ende der Rückdehnung. Nach besonders langer Färbung (21 bis 28 Stunden) lebten die Zellen zunächst noch; einzelne große, stark lichtbrechende und tief dunkelgelb gefärbte Tropfen lagen im Plasma und füllten bisweilen das ganze Zellende. Diese Schnitte waren nicht mehr plasmolysierbar. In diesem Zusammenhang ist der Angabe von Wulff (1934) zu gedenken, der in Pollenschläuchen unter der Wirkung des Chrysoidins vollständige Ausscheidung der färbbaren Lipoidanteile beobachtete.

Ich verwendete für die Permeabilitätsversuche Färbezeiten von nicht mehr als $1^1/_2$ Stunden, da nur bis zu etwa dieser Grenze die kombinierte Wirkung von Farbstoff und Diosmotikum gut vertragen wurde.

Verlauf der Permeabilitätsversuche. In Harnstoff (1,0 mol) plasmolysieren die ungefärbten Zellen mit konkavbuchtigen Formen, dann erfolgt, beschleunigt durch die Permeation, baldige Rundung und nach etwa 1 Stunde Deplasmolyse. Auch in Glyzerin gibt es konkaven Eintritt und baldige Rundung. In Zuckerlösung (0,7 mol) dagegen bleibt die eckige Plasmolyseform durch mehrere Stunden erhalten. Harnstoff, Glyzerin und Zucker werden gut vertragen.

Glykol schädigt anscheinend nur durch die überaus rasche Rückdehnung, der das Plasma nicht rasch genug folgen kann; nach der Deplasmolyse, die in weniger als 3 Minuten erreicht ist, leben die Zellen noch und der Deplasmolysezeitversuch gelangt auch da zu einem gültigen Wert, wie durch eine parallele plasmometrische Bestimmung festgestellt wurde.

In gefärbten Zellen treten während des Harnstoffversuches Kappenplasmolysen auf. Da weder in Chrysoidin Vakuolen-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

kontraktion, noch in Harnstoff allein Kappen entstehen, müssen sie auf die kombinierte Wirkung beider Einflüsse zurückgehen; wahrscheinlich ist, ähnlich wie bei Solanum, die infolge der Färbung verlängerte Einwirkungszeit der Harnstofflösung die Ursache. In den anderen Plasmolyticis fand ich keine Quellungserscheinungen.

Die Permeabilität vitalgefärbter Zellen. Die Versuche mit Harnstoff zeigen hemmende Wirkung der Vitalfärbung, so in Nr. 102, 105, 104, 99, 103, deren Material streng vergleichbar ist, Herabsetzung auf 24 bis 29% der Kontrolle, in Nr. 69, 70 auf 52% der Kontrolle und in Nr. 79, 81 a auf 41%. Wässerung von langer Dauer (7 bzw. 22 Stunden) scheint auch bei diesem Objekt die hohe Harnstoffpermeabilität zu vermindern, so im Vers. 89 auf 31% im Vergleich zu 81 a. Nr. 89 dient seinerseits als Kontrollversuch zu dem ähnlich lang gewässerten Versuch 87.

Im Exosmoseversuch verschwindet auch bei Daucus der Farbstoff wieder aus den Zellen. Im Versuch 74 wurde 2 Std. 30 Min. gefärbt (die Zellen würden einen unmittelbar anschließenden Permeabilitätsversuch nach dieser Färbungszeit nicht überleben) und dann 4 Std. 53 Min. gewässert. Der Schnitt war noch nicht restlos entfärbt und die Durchlässigkeit gegenüber der Kontrolle mit 60% noch immer erniedrigt. Ein zweiter, ebenso vorbehandelter, streng vergleichbarer Schnitt wurde 22 Std. 24 Min. gewässert und gab, verglichen mit einer Kontrolle ähnlicher Wässerungsdauer, 90% der Kontrolle (Nr. 89, 87).

In Glykol sind die gefärbten Zellen etwas durchlässiger als die ungefärbten (Nr. 111, 112, 113, 116 mit 133 und 138% der Kontrolle).

Glyzerin — nur einmal geprüft — gibt für den gefärbten Schnitt 79% der Kontrolle (Vers. Nr. 120, 127, 128).

## VI. Besprechung und Deutung der Ergebnisse.

Unsere Untersuchung bezieht sich auf zwei Gebiete der Zellphysiologie — Vitalfärbung und Permeabilität — und berührt ein drittes, die Plasmaquellung.

Zur Vitalfärbung: Mit Wulff (1934) (siehe auch Becker, 1936) dürfen wir annehmen, daß es Lipoide sind, welche das Chrysoidin zunächst bei diffuser Färbung festhalten. Sodann folgt Speicherung in vorhandenen Lipoidtröpfchen und Entmischung weiterer Lipoide aus dem Plasma. Bei Narcissus hielt sich die Ausbildung der gefärbten Tröpfchen im unschädlichen Bereich, bei Daucus kam es zur Abscheidung großer, tiefgelb ge-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

färbter Tropfen — aber erst nach allzulanger Färbung und unter Schädigung. Die Feststellung von Schaede (1923), wonach die Speicherung des Chrysoidins aus verschiedenen Konzentrationen jeweils nur bis zu einem gewissen Grade geht und nicht bis zu einem für alle Konzentrationen gleichen Maximum getrieben wird, kann insoferne bestätigt werden, als die Dauer der Färbung nach Einstellung eines gewissen Gleichgewichtes, etwa über 1 bis 2 Stunden hinaus, nicht mehr viel Einfluß auf das Färbungsbild und auf die Permeabilitätsänderungen ausübt.

Nach Drawert (1940) können wir annehmen, daß der Farbstoff bei $p_H$ 7 bis 8 (dem $p_H$ unseres Brunnenwassers) in molekularer Form vorliegt; in dieser lipophilen Form wird er von den Plasmalipoiden gespeichert.

Die Zellsäfte von Narcissus und Solanum speichern den Farbstoff aus Leitungswasser als Lösungsmittel nicht. Wir dürfen mit Höfler (1948) annehmen, daß „leere" Zellsäfte vorliegen, in denen das erst unterhalb von $p_H$ 5 dissoziierte Chrysoidin nicht in Form von Ionen vorliegt, die für die Speicherung in Frage kämen; (nur bei Daucus kommt nach langer Färbungsdauer Krümelspeicherung im Zellsaft vor). Auch das Wundrandphänomen[16], das nach Höfler (l. c.) auf Speicherung des Farbstoffes in ionisierter Form zurückgeht, war nicht zu beobachten. Schließlich dürfte auch die Reversibilität der Färbung wesentlich davon abhängen, daß der Farbstoff in den Protoplasten nicht dissoziiert (Höfler 1947 a, 1947 b). Auch Wulff (1934) nahm an, daß der Farbstoff echt gelöst wird.

Die Färbung wurde, wie schon bemerkt, in meinen Versuchen nur so weit getrieben, daß der Permeabilitätsversuch von gefärbten Zellen ohne gröbere Schädigung ertragen wurde. Nach der Terminologie von Strugger (1936 b) war die Färbung turbant und reversibel, wobei offengelassen werden muß, ob sie sich nicht durch Weiterkultur als inturbant hätte erweisen können. Bemerkenswert ist, daß stärkere Färbung, die bei sofortiger Plasmolyse zum Tode der Zellen geführt hätte, nach Exosmose des Chrysoidins keine Spur einer Wirkung hinterließ.

Quellungserscheinungen. Alle drei Objekte zeigten Erscheinungen der Plasmaquellung, die auf mindest zwei verschiedene Ursachen zurückgehen. Bei Narcissus bestand die Quellung zunächst in Vakuolenkontraktion, die als Folge der Vital-

[16] Das Wundrandphänomen besteht nach Höfler (l. c.) in der Erscheinung verstärkter oder abweichender (metachromatischer) Färbung von Protoplasten am Rande des lebenden Zellfeldes der Schnittpräparate.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

färbung auftrat und im Plasmolytikum als Kappenplasmolyse fortbestand oder, wenn die Farbstoffeinwirkung später begonnen hatte, in diesem erst zustande kam. Bei Kartoffel fanden sich Kappenplasmolysen unter dem alleinigen Einfluß der rapiden Harnstoff- oder Methylharnstoffpermeation und unabhängig von der Einwirkung des Chrysoidins, bei Daucus dagegen nur unter dem gleichzeitigen Einfluß von Vitalfärbung und Harnstoffpermeation, wobei die Vitalfärbung anscheinend nur als die Ursache verlängerter Harnstoffeinwirkung eine Rolle spielt.

Vakuolenkontraktion als Folge von Vitalfärbung wurde durch Küster (1927) für Alliumzellen und durch Gicklhorn und Möschl (1930) für Cladophora beschrieben. Weber (1930) stellte fest, daß Neutralrot in Blattzellen von Elodea nur dann Vakuolenkontraktion auslöst, wenn es in Leitungswasser und nicht, wenn es in destilliertem Wasser gelöst ist; nach Kunze (1930) tritt die Erscheinung bei Elodea erst oberhalb von $p_H$ 7,2 ein. Strugger (1936a) fand die gleiche Abhängigkeit für die innere Schuppenepidermis von Alliumzwiebeln und zeigte, daß nach erfolgter Membranfärbung Übertragung in alkalische Lösung Umfärbung von der Membran nach dem Zellsaft und Vakuolenkontraktion herbeiführt und daß die genaue Umkehrung dieses Vorganges in schwach saurem Medium erfolgt.

Henner (1934) unterschied „schwache" Vakuolenkontraktion, bei der die Vakuole weniger als die Hälfte ihres Volumens verliert und die Zelle gewöhnlich weiterhin am Leben bleibt, von der in der Regel auf einzelne Zellen beschränkten „starken" Kontraktion, bei der sich die Vakuole zu einer kleinen Kugel zusammenzieht und die Zelle bald abstirbt. Höfler (1948) spricht deshalb treffender von „Allgemein-" und „Einzelkontraktion".

Die in Chrysoidin an Narcissus beobachtete Vakuolenkontraktion tritt in allen Zellen des Schnittes auf und ist tatsächlich „schwache" und zugleich Allgemeinkontraktion. Sie scheint in einer aktiven Quellung des Plasmas zu bestehen, bei der die Vakuole zu einer passiven Rolle verurteilt ist, denn bei Plasmolyse verkleinern die Plasmakappen zwar ihr Volumen (in 1,0 mol Harnstoff um 40%), verschwinden jedoch nicht, und bei kürzerer Färbungsdauer entstehen erst im Plasmolytikum Kappenplasmolysen. Mit Verschwinden der Färbung geht die Plasmaquellung zurück — eine Parallele zu Struggers Umfärbungsversuchen mit Neutralrot.

Küster (1933) findet, daß mit Prune pure Alliumzellen sich nur dann anfärben, wenn sie infolge Wundreiz Vakuolenkontraktion aufweisen, und nimmt an, daß erst die Vakuolenkontraktion als leichte Schädigung die Voraussetzung für die Speicherung des Farbstoffes darstellt. Demgegenüber wird mit Chrysoidin die Plasmaquellung durch die Färbung selbst erzeugt.

Senkung des osmotischen Wertes, wie sie nach Henner (l. c.) zu der Spontankontraktion der Vakuole zu gehören scheint, liegt in den Färbungsversuchen nicht vor, was ebenfalls dafür spricht, daß die aktive Rolle hier dem Plasma zukommt und nicht der Vakuole.

Zugleich mit der Plasmafärbung und der Aufquellung geht die Entmischung der Lipoide vor sich. Vor der sichtbaren mag eine submikroskopische Entmischung einhergehen, die Störung des Gleichgewichtes zwischen Lipoid, Gerüstsubstanzen und Lösung des im Sinne von Frey-Wyssling (1938) aufzufassenden Plasmagefüges bewirkt. Die Quellung

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

deutet darauf hin, daß nicht nur die Lipoide entmischt werden, welche um die hydrophilen und lipophilen Gruppen der Polypeptidketten gelagert sind, sondern daß auch Bindungen gelöst werden; im Hinblick auf die Reversibilität von Färbung und Quellung sind jedoch tiefergreifende Strukturänderungen unwahrscheinlich, zumal das Plasma nach Schwinden der Färbung nicht nur dem Aussehen und der Viskosität nach, sondern sogar in seiner Neigung zu Systrophe, Plasmaströmung usw. wieder hergestellt wird.

Ein ganz anderer Fall ist die Quellung des Solanumplasmas in Harnstoff oder Methylharnstoff, die mit der Vitalfärbung nicht zusammenhängt. Höfler (1939 a) hat eine ähnliche Erscheinung in Sulfoharnstoff an Epidermiszellen des Stengels von Gentiana Sturmiana erhalten, die dort zum baldigen Tod der Zellen führt. Biebl (1948) beschreibt Kappenplasmolysen der Kartoffelepidermis in höheren Konzentrationen von Methylharnstoff, wobei er feststellen konnte, daß die Permeabilität — wie auch in der vorliegenden Studie — durch die Plasmaquellung nicht geändert wird. Hier sind auch die Kappenplasmolysen anzuführen, welche derselbe Autor bei Allium cepa nach Bestrahlung mit $\alpha$-Strahlen bzw. mit UV in Lösungen von Harnstoff, Glyzerin usw. entstehen sah und deren Zustandekommen er im Sinne einer über die Permeabilität überwiegenden Intrabilität deutete (Biebl 1940, 1942 a, b).

In allen angeführten Fällen dürfte — wie bei der Kappenplasmolyse in Alkalisalzen (Höfler, 1928) — die Entstehung der Kappen darauf zurückgehen, daß die äußere Plasmagrenzschicht für das Diosmotikum durchlässiger ist als der Tonoplast, daß also die Intrabilität die Permeabilität übersteigt. Wenn nun, wie in unserem Falle, noch dazu die äußeren Plasmapartien etwas verfestigt sind und der osmotischen Kontraktion der Vakuole nicht sofort folgen können, wird das Binnenplasma mit dem Diosmotikum überschwemmt und auseinandergezerrt, so daß das Zustandekommen der Quellung auch mechanisch durch Störung der Plasmastruktur gefördert wird. Grundsätzlich dieselbe Erscheinung glaube ich gesehen zu haben, wenn ich (Hofmeister, 1940) konzentrierte Glukose- oder Harnstofflösung durch Mikroinjektion in das Plasma plasmolysierter Zwiebelzellen einführte, oder auch größere Wassermengen sehr rasch injizierte. Ich glaube, annehmen zu dürfen, daß Überschwemmung des Plasmas mit Wasser, gleichgültig, ob sie direkt oder mittelbar durch Einbringen konzentrierter Lösung hervorgerufen wird, die Quellung zunächst mechanisch unter gleichzeitiger Lösung noch nicht näher zu definierender Bindungen bewirkt[17] (Störung des Eiweißgerüstes). In dieser Erklärung ist das Wesen der Plasmoschise, das Auseinanderweichen der widerstandsfähigeren Außen- und Innenpartien des Plasmas mit eingeschlossen, wie auch erklärt ist, warum bei mikrurgischer vorsichtiger Einführung von reinem Wasser in kleinen Mengen das Plasma wieder osmotisch abschwillt, während es bei plötzlicher, weitergehender Aufschwellung nach meinen damaligen Erfahrungen (wenigstens zunächst) nicht mehr entquillt, trotzdem es in hypertonischer Zuckerlösung liegt. Die langsamere Kappenbildung in gefärbten Zellen entspricht der geringeren Permeabilität dieser für Harnstoff und hat keinen anderen Bezug auf die Wirkung der Färbung. Über die Plasmaquellung bei Daucus wurde weiter oben bereits bemerkt, daß sie anscheinend prinzipiell in der gleichen Weise zu erklären ist wie die von Solanum, wobei es auf die verlängerte Einwirkungszeit des Harnstoffs ankommt.

[17] Es darf indessen nicht versäumt werden, auf die Bedenken hinzuweisen, welche Höfler (1939 b) gerade im Hinblick auf das hochgradig gequollene Plasma seiner Kappenplasmolysen gegen eine Erklärung des Plasmabaues im Sinne der Haftpunkttheorie ausspricht.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Es bleibt noch abschließend zu betonen, daß die Quellung bei Narcissus und die bei Solanum bzw. Daucus zwei gänzlich verschiedene Vorgänge darstellt.

Die Permeabilitätsänderungen. Narcissus, nur mit Harnstoff geprüft, weist starke Erhöhung der Durchlässigkeit als Folge der Färbung auf; bei Solanum ist Harnstoff in gefärbten Zellen kräftig gehemmt, während Methylharnstoff (und Wasserpermeabilität) gleichbleiben und Glyzerin[18], Glykol, Erythrit, Malonamid gefördert sind. Bei Daucus ist Harnstoff ebenfalls gehemmt, Glyzerin nur wenig verlangsamt und Glykol gefördert.

Eine theoretische Deutung der Permeabilitätsänderungen wird nicht an den sichtbaren Plasmaveränderungen vorbeigehen dürfen. Bei Narcissus war Verflüssigung und Quellung des gefärbten Plasmas (Vakuolenkontraktion oder Kappenplasmolyse) mit Steigerung der Permeation in aufeinanderfolgenden Intervallen einzelner Versuche verbunden. Bei Daucus und Solanum trat im Gegensatz dazu unter dem Einfluß des Chrysoidins leichte Erstarrung des Plasmas ein (s. S. 65).

Änderungen der Permeabilität ein und desselben Plasmas sind in der Literatur mehrfach beschrieben und theoretisch gedeutet worden, wie auch das gegenläufige Verhalten von Amiden und Alkoholen in den Permeabilitätsreihen schon Beachtung und Deutung gefunden hat.

Rottenburg (1943) untersuchte an verschiedenen Plasmen die Permeabilität für Harnstoff und Glyzerin in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration der Außenlösung. Bei verschiedenen Objekten nahm im alkalischen Bereich die Permeabilität für Harnstoff und Glyzerin zu; bei anderen, für Harnstoff hoch durchlässigen, nahm sie ab, während die Glyzerindurchlässigkeit unverändert blieb und die Plasmaviskosität erhöht war (längere Rundungszeit). Geförderte Permeation zeigten unter anderen Muscari racemosum, Tradescantia elongata und Majanthemum bifolium, die bei niederer bis mittlerer Harnstoffdurchlässigkeit dem Chara-Majanthemum-Typ nach Höfler (1937, 1942) zuzurechnen sind; unser Objekt Narcissus kann ihnen an die Seite gestellt werden[19]. Hemmung zeigten dagegen Campanula trachelium und Gentiana Austriaca, die Höflers „rapidem Harnstofftyp" bzw. „amidophilem Porentyp" zugezählt werden müssen, deren hohe Durchlässigkeit für Harnstoff also auf Porenpermeation dieser

[18] Die Hemmung des letal endenden Versuches Nr. 129 ist nicht gewertet.

[19] Geförderte Permeabilität zeigten jedoch auch Objekte mit höherer Harnstoffdurchlässigkeit.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Substanz beruhen soll. Hier wäre unser Solanum anzureihen, das nach Biebl (1948 a) demselben Typ zugehört, vielleicht auch Daucus, dessen Permeabilitätsreihe aber noch nicht bekannt ist.

Nach Rottenburgs Deutung soll bei alkalischer Reaktion der Porenweg verlegt und der Lösungsweg begünstigt sein. Bei den ursprünglich stark porenpermeablen Plasmen (Gentiana, Campanula) wäre infolgedessen der Harnstoff gehemmt; dagegen soll er dort, wo er nur auf dem Lösungswege und deshalb langsam permeierte, nun gefördert sein (Muscari usw. — in meinen Versuchen Narcissus). Die Veränderungen sollen auf Quellung der lipoiden Phase im basischen Bereich beruhen. Modellversuche, welche diese letztere Annahme stützen könnten, existieren bis jetzt nicht.

Tatsächlich fand ich bei den hochpermeablen Objekten Solanum und Daucus Viskositätserhöhung (Entquellung?) und herabgesetzte Harnstoffdurchlässigkeit, aber nur geringe Veränderung der niedrigen Glyzerinpermeabilität; bei dem niedriger permeablen Narcissus zeigte sich Erhöhung für Harnstoff.

H. Schmidt (1939) fand unter den Bedingungen trockener und feuchter Kultur verschiedene Permeabilitätsreihen des für Harnstoff rapid permeablen Plasmas von Lamium, womit unsere Befunde an Solanum und Daucus vergleichbar sind. Trocken kultivierte Pflanzen sind für Harnstoff und andere Amide langsamer, für Alkohole rascher durchlässig als die feucht gehaltenen und zeigen auch Viskositätserhöhung. Schmidt nimmt als Erklärung veränderte Zusammensetzung der Zell-Lipoide an und führt nur das Verhalten des kleinmolekularen Harnstoffs auf eine Herabsetzung der Porenpermeabilität durch Entquellung zurück. Er läßt offen, ob die Verengung der Poren durch Entquellung unter Verminderung freien intermizellaren Wassers oder durch stärkere Hydratation der „Mizellen“ (Kessler und Ruhland, 1938) zustande kommen soll.

An dieser Stelle ist die Permeabilitätsverminderung für Harnstoff zu erwähnen, welche ich nach Dauerwässerung bei Solanum und Daucus fand; für sie wäre zwischen der Deutung von Kessler und Ruhland und der von Rottenburg (Verquellung der Lipoide) zu entscheiden.

Die gegenläufig wechselnde Stellung der Amide und Alkohole in den Permeabilitätsreihen verschiedener Objekte erklärte Wilbrandt (1932) durch gruppengebundene Löslichkeitsbeziehungen zwischen diesen Stoffen und den von Objekt zu Objekt verschieden zusammengesetzten Lipoiden. In unserem Falle wäre an eine Veränderung der Lipoidzusammensetzung der Grenzschichten infolge von Entmischungsvorgängen zu denken; als Modell dafür wäre

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

etwa das Verhältnis zwischen Öl und Öl + Ölsäure nach Collander und Bärlund (1933) heranzuziehen. Gegenüber Öl + Ölsäure begünstigt Öl allein die Alkohole viel mehr als den Harnstoff.

Bogen (1938, 1940) beschreibt Änderungen der Permeabilität für Harnstoff und Glyzerin, welche unter der Einwirkung von Salzen zustande kommen, aber auch Beeinflussung der Glyzerindurchlässigkeit durch gleichzeitig einwirkenden Harnstoff. Der Autor nimmt Abhängigkeit der Permeabilität von der Quellungswirkung der Ionen an; da sich strenge Abhängigkeit im Sinne der Adsorptionsreihe bzw. der lyotropen Reihe nicht ergibt, wird angenommen, daß Harnstoff und Glyzerin den Quellungszustand von Plasma und Grenzschichten auch ihrerseits beeinflussen. Um den Chrysoidineinfluß im Sinne von Bogen zu deuten, müßten wir Entquellung als Ursache verminderter Harnstoffpermeabilität dort annehmen, wo wir unter dem Einfluß eben dieses Stoffes mächtige Plasmakappen entstehen sehen (Solanum) und Quellung durch Glyzerin oder Glykol, wo das Plasma sichtlich normal bleibt. Höfler (1942) hat darauf hingewiesen, daß die von Bogen angenommenen Quellungseffekte nicht völlig unsichtbar bleiben könnten, wenn sie wirklich vorhanden wären, und daß Sekundärwirkungen von Harnstoff und Glyzerin vor allem in ungleicher (steigender, sinkender) Permeation während verschiedener Intervalle des einzelnen Versuches zum Ausdruck kommen müßten, wie dies z. B. von Hofmeister (1935) für Glykol beschrieben ist. Zumindest bei den hier verwendeten Versuchspflanzen wurde eine derartige Wirkung von Harnstoff oder Glyzerin auf die eigene Durchtrittsgeschwindigkeit nie wahrgenommen; die Erklärungen Bogens scheinen also in unserem Falle nicht anwendbar.

Nach diesem Überblick soll eine Deutung der eigenen Befunde über den Einfluß des Chrysoidins auf die Permeabilität versucht werden, die sich nach Möglichkeit an befriedigende Theorien der erwähnten Autoren anschließen soll.

Eine Erklärung der erhöhten Permeabilität bei Narcissus wird nicht an den zwei auffallenden Erscheinungen vorbeigehen dürfen, welche sie begleiten: an der Vakuolenkontraktion bzw. Plasmaquellung und an der Entmischung von gefärbten Lipoidtröpfchen im Plasma. Die ausgeschiedenen Lipoide mögen zum Teil aus den Grenzschichten stammen; doch deutet die Quellung darauf hin, daß durch die Farbstoffeinwirkung auch Bindungen im Plasma gelöst und dadurch weitere Lipoide entmischt werden. Wird die Gesamt-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

menge der Lipoide in der Grenzschicht geringer, dann kommen von ihnen nicht mehr besetzte Anteile der Protoplastenoberfläche nun für die raschere Porenpermeation des kleinmolekularen Harnstoffes in Frage; wir nehmen also für diesen Stoff Übergang von der Lösungspermeation zur Porenpermeation (ganz oder teilweise) an. Eine zweite mögliche Erklärung für erhöhte Permeation ist Quellung des Plasmas unter Vergrößerung von „Poren".

Bezüglich der Objekte Daucus und Solanum müssen wir zur Erklärung sowohl Veränderungen der Lipoidlöslichkeit wie der Porengröße heranziehen: beide Objekte sind als „amidophiler Porentyp" zu bezeichnen (s. S. 75), und bei beiden ist als Wirkung des Chrysoidins eine leichte Viskositätserhöhung (Entquellung?) des Plasmas zu beobachten. Die Herabsetzung der Harnstoffdurchlässigkeit kann im Sinne von Schmidt auf die Entquellung zurückgeführt werden, wobei entweder an Veränderung der Porengröße oder daran gedacht werden kann, daß dem Harnstoff der Porenweg überhaupt verschlossen wird, so daß er auf den Lösungsweg angewiesen ist. Wie Schmidt bei Lamium und Rottenburg bei Gentiana und Campanula, fand auch ich Viskositätsverminderung und gesenkte Harnstoffpermeabilität verbunden. Das Verhalten der übrigen Verbindungen wäre durch geänderte Löslichkeitsbedingungen in den Lipoiden der Plasmagrenzschicht zu erklären, die durch Entmischung von Lipoiden und damit verbundene Änderung der Zusammensetzung der Grenzschicht zustande kommen dürften.

Die Plasmaquellung, welche bei Solanum und Daucus im Verlaufe der Harnstoffversuche mit und ohne Chrysoidin eintritt, ist mit Permeabilitätsänderungen nicht verbunden; man muß annehmen, daß sie nur das Binnenplasma und nicht die Grenzschichten betrifft, und sich daran erinnern, daß für das Binnenplasma überhaupt ein viel lockerer Bau anzunehmen ist als für die Grenzschichten (Frey-Wyssling 1938, S. 157).

Eine gewisse Schwierigkeit bietet sich dem Versuch, die Wirkung von Neutralrot und Methylenblau auf die Permeabilität (Hofmeister, 1938) mit denselben Mitteln zu erklären. Die leichte Permeabilitätserhöhung nach geringer Anfärbung der Vakuole mit diesen Farbstoffen mag auf unbestimmbare Einflüsse der Färbung zurückgehen und nichts anderes sein als der Ausdruck erhöhter Streuung der Permeationswerte. Erst wenn im Zellsaft deutlicher Farbniederschlag auftritt, ist die Permeabilität ausgiebig gehemmt. Ob etwa Entmischung einer Phase des Zellsaftes Veränderungen auch im Plasma nach sich zieht oder ob der Farbstoff nun nach Sättigung der Vakuole seine Wirkung auf das Plasma ausüben

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

kann, z. B. durch Absättigung saurer Gruppen, wage ich nicht zu entscheiden; immerhin handelt es sich auch da um basische Farbstoffe, so daß gewisse Parallelen mit Chrysoidin möglich wären.

Für die Vitalfärbung als Untersuchungsmethode entnehmen wir aus der vorliegenden wie aus der früheren Untersuchung (1938), daß wir keinesfalls von vornherein annehmen dürfen, vitalgefärbte Zellen könnten in ihren plasmatischen Eigenschaften unverändert bleiben; jedenfalls sind für die Permeabilität und für die Viskosität des Plasmas Änderungen infolge der Vitalfärbung zu erwarten, die zunächst nicht einmal der Richtung nach vorausberechnet werden können, wenn das Objekt nicht schon bekannt ist.

Für das Studium der Vitalfärbung empfangen wir die Anregung, die Veränderungen, welche gut faßbare Plasmaeigenschaften unter dem Einfluß der Vitalfärbung erleiden, auf breiterer Grundlage zu untersuchen; aus der zu erwartenden Mannigfaltigkeit von Einzelbefunden mögen sich sodann Erkenntnisse über die Farbstoffbindung im Plasma und über seinen Aufbau ergeben. Vielleicht wird besonderes Augenmerk darauf zu legen sein, wieweit etwaige Reversibilität der Färbung von einer Wiederherstellung der ursprünglich festgestellten Plasmaeigenschaften gefolgt ist; vielleicht könnten auch neben oder an Stelle der Permeabilitätsmessung andere Plasmaeigenschaften bestimmt werden, deren Feststellung mit geringerer Belastung des Lebenszustandes der Protoplaste erfolgen kann, so daß die Versuche weiter in den subletalen Bereich vorgetrieben werden können.

## VII. Zusammenfassung.

Durch Vitalfärbung mit Chrysoidin wird die Permeabilität für Anelektrolyte verändert; diese Veränderung ist bezüglich ihrer Höhe und Richtung nach Objekt und Diosmotikum verschieden; nach den bisherigen Erfahrungen ist zu vermuten, daß bei Plasmen, die für Harnstoff rapid durchlässig sind, die Permeabilität für Harnstoff (und andere Amide) gehemmt und die für Glyzerin (und andere Alkohole) gefördert wird. Diese Wirkung trat bei dem für Harnstoff hochdurchlässigen Objekt Solanum (und ähnlich bei Daucus) auf, während die an sich niedrige Harnstoffdurchlässigkeit von Narcissus erhöht wurde.

Die Wirkung der Chrysoidinfärbung auf die Permeabilität verschwindet vollkommen, wenn der Farbstoff durch Wässerung wieder aus den Zellen entfernt wird; dies gilt auch für Färbungsgrade, die in einem unmittelbar folgenden Permeabilitätsversuch den Tod der Zellen verursachen würden.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Nebenbeobachtungen betreffen Vakuolenkontraktion, die durch Chrysoidin bei Narcissus, und Plasmaquellung, die durch Harnstoff bei Solanum (und Daucus) hervorgerufen wird.

Eine vorläufige theoretische Deutung wird auf der Grundlage bestehender Theorien versucht. Es wäre zu erwarten, daß ausführliches Studium des Einflusses, den die Vitalfärbung auf verschiedene Eigenschaften und Konstanten des Protoplasmas ausübt, Aufschlüsse über Fragen der Plasmastruktur wie auch der Farbstoffbindung im Plasma geben könnte.

Die neben der plasmometrischen Methode verwendete Permeabilitätsbestimmung nach der Deplasmolysezeit hat sich in dieser Untersuchung als brauchbar erwiesen.

## VIII. Literatur.

Becker, W. A., 1936, Vitale Cytoplasma- und Kernfärbungen. Sammelreferat. Protoplasma **26**, 439.

Biebl, R., 1940, Weitere Untersuchungen über die Wirkung der $\alpha$-Strahlen auf die Pflanzenzelle. Protoplasma **35**, 187.

— 1942 a, Wirkung der UV-Strahlung auf Allium-Zellen. Protoplasma **36**, 491.

— 1942 b, Wirkung der UV-Strahlen auf die Plasmapermeabilität. Protoplasma **37**, 1.

— 1948, Permeabilitätsversuche an der Kartoffelpflanze. Öst. Bot. Zeitschr. **95**, 129.

— 1949, Zellphysiologische Untersuchungen an Gemüsepflanzen. Biologia Generalis **19**, H. 2.

Bogen, H. J., 1937, Über die Ursachen der Unterschiede in der „spezifischen" Harnstoffpermeabilität. Planta **27**, 611.

— 1938, Untersuchungen zu den „spezifischen Permeabilitätsreihen" Höflers. II. Harnstoff und Glyzerin. Planta **28**, 535.

— 1940, Untersuchungen über den Quellungseffekt permeierender Anelektrolyte. I. Ionenwirkung auf die Permeabilität von Rhoeo discolor. Zeitschr. f. Botanik **36**, 65.

— 1941, Untersuchungen über den Quellungseffekt permeierender Anelektrolyte. II. Ionenwirkung auf die Permeabilität von Gentiana cruciata. Planta **32**, 150.

Collander, R., und Bärlund, H., 1933, Permeabilitätsstudien an Chara ceratophylla. II. Acta bot. Fenn. **11**, 1.

Drawert, H., 1938, Über die Aufnahme von Prune pure durch die pflanzliche Zelle. Planta **29**, 179.

— 1940, Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora **34**, 159.

Frey-Wyssling, A., 1938, Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Protoplasma-Monographien **15**. Bornträger, Berlin.

Gicklhorn, J., und Möschl, L., 1930, Vitalfärbung und Vakuolenkontraktion an Zellen mit stabilem Plasmaschaum. Protoplasma **9**, 521.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Guilliermond, A., et Gautheret, R., 1938 a, Culture de Saprolegnia diclina en milieux additionnés de colorants. C. r. Soc. Biol. Paris **128**, 493.
— 1938 b, Observations sur l'action de divers colorants sur les cellules végétales vivantes. C. r. Acad. Sc. Paris, t. **206**, 1517.
Henner, J., 1934, Untersuchungen über Spontankontraktion der Vakuolen. Protoplasma **21**, 81.
Höfler, K., 1928, Über Kappenplasmolyse. Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. **46** (73).
— 1937, Spezifische Permeabilitätsreihen verschiedener Zellsorten derselben Pflanze. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **55**, 133.
— 1939 a, Nekrose in Sulfoharnstoff. Flora **133**, 131.
1939 b, Kappenplasmolyse und Ionenantagonismus. Protoplasma **33**, 545.
— 1942, Unsere derzeitige Kenntnis von den spezifischen Permeabilitätsreihen. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **60**, 179.
— 1943, Über Fettspeicherung und Zuckerpermeabilität einiger Diatomeen und Diagonalsymmetrie im Diatomeenprotoplasten. Protoplasma **38**, 74.
— 1947 a, Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie **2**, 13.
— 1947 b, Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., I. Abt. **156**, 585.
— 1948, Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Mikroskopie, 1. Sonderheft: „Fluoreszenzmikroskopie", S. 46.
— und Stiegler, A., 1921, Ein auffälliger Permeabilitätsversuch in Harnstofflösung. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **39**, 157.
— 1930, Permeabilitätsverteilung in verschiedenen Geweben der Pflanze. Protoplasma **9**, 469.
Hofmeister, L., 1935, Vergleichende Untersuchungen über spezifische Permeabilitätsreihen. Bibliotheca Botanica **113**, 1.
— 1938, Studien über die Permeabilität vital gefärbter Pflanzenzellen. I. Versuche mit Neutralrot und Methylenblau. Zeitschr. f. wiss. Mikr. **55**, 393.
— 1940, Studien über Mikroinjektion in Pflanzenzellen. Zeitschr. f. wiss. Mikr. **57**, 274.
— 1949, Über Permeabilitätsbestimmung nach der Deplasmolysezeit. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. I. Abt. **157**, 83.
Kessler, W., und Ruhland, W., 1938. Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta **28**, 159.
Kreuz, J., 1941, Der Einfluß von Calzium- und Kaliumsalzen auf die Permeabilität des Protoplasmas für Harnstoff und Glyzerin. Österr. Bot. Zeitschr. **90**, 1.
Küster, E., 1926, Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. Protoplasma **1**, 73.
— 1933, Über Färbung lebenden Protoplasmas von Pflanzenzellen mit Prune pure. Zeitschr. f. wiss. Mikr. **50**, 409.
Kunze, R., 1930, Der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf die Bildung der Vakuolenkontraktion vitalgefärbter Elodea-Zellen. Protoplasma **12**, 161.
Lanz, I., 1936, Über die Wirkung des Chrysoidins auf den Zellenkern. Zeitschr. f. wiss. Mikr. **53**, 387.
Rottenburg, W., 1943, Die Plasmapermeabilität für Harnstoff und Glyzerin in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. Flora **37**, 230
Ruhland, W., 1912, Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. Jahrb. f. wiss. Bot. **51**, 376.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at


Schaede, R., 1923, Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen. Jahrb. f. wiss. Bot. **62**, 65.
— 1924, Untersuchungen über Zelle, Kern und ihre Teilung am lebenden Objekt. Beitr. z. Biol. d. Pfl. **14**, 231.
Schmidt, H., 1939, Plasmazustand und Wasserhaushalt bei Lamium maculatum. Protoplasma **33**, 25.
Strugger, S., 1936 a, Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung mit Neutralrot. Protoplasma **26**, 56.
— 1936 b, Die Vitalfärbung der Chloroplasten von Helodea mit Rhodaminen. Flora **31**, 113.
— 1938, Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6 G. Protoplasma **30**, 85
Weber, F., 1930, Vakuolen-Kontraktion vital gefärbter Elodea-Zellen. Protoplasma **9**, 106.
Wilbrandt, W., 1932, Vergleichende Untersuchungen über die Permeabilität pflanzlicher Protoplaste für Anelektrolyte. Pflügers Archiv **229**, 86.
Wulff, H. D., 1934, Lebendfärbungen mit Chrysoidin. Planta **22**, 70.